

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00816403.7

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/12

C12Q 1/68 C12P 21/08

C12N 1/15 C12N 1/19

C12N 1/21 C12N 5/10

[43] 公开日 2003 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 1402783A

[22] 申请日 2000.9.29 [21] 申请号 00816403.7

[30] 优先权

[32] 1999.9.29 [33] JP [31] 275947/1999

[86] 国际申请 PCT/JP00/06804 2000.9.29

[87] 国际公布 WO01/23557 日 2001.4.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.29

[71] 申请人 帝人株式会社

地址 日本大阪府大阪市

[72] 发明人 山名庆 长泽幸美 和田仁

笠原义典

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 23 页 序列表 28 页

附图 10 页

[54] 发明名称 新型多肽及其编码基因

[57] 摘要

本发明提供具有序列号 2、4 和 6 所示氨基酸序列的多肽及编码该多肽的 DNA，以及针对该多肽的抗体，以及这些物质的使用。上述氨基酸序列与调节软骨细胞增殖及分化和具有血管新生抑制作用的软骨调节因子 -I 具有同源性。

ISSN 1008-4274

1. 一种人基因, 它编码实质上含有序列号 2 所示的氨基酸序列的多肽。
2. 一种小鼠基因, 它编码实质上含有序列号 4 所示的氨基酸序列的多肽。
3. 一种大鼠基因, 它编码实质上含有序列号 6 所示的氨基酸序列的多肽。
4. 权利要求 1 所述的人基因, 它具有序列号 1 所示的碱基序列。
5. 权利要求 2 所述的小鼠基因, 它具有序列号 3 所示的碱基序列。
6. 权利要求 3 所述的大鼠基因, 它具有序列号 5 所示的碱基序列。
7. 一种人基因编码的多肽, 它实质上含有序列号 2 所示的氨基酸序列。
8. 一种小鼠基因编码的多肽, 它实质上含有序列号 4 所示的氨基酸序列。
9. 一种大鼠基因编码的多肽, 它实质上含有序列号 6 所示的氨基酸序列。
10. 一种寡核苷酸探针, 它与权利要求 1-6 任一项所述的基因的至少一部分杂交。
11. 一种重组 DNA, 它含有权利要求 1-6 任一项所述的基因。
12. 一种转化体, 它由权利要求 11 所述的重组 DNA 转化而来。
13. 一种制备上述多肽的方法, 其特征在于, 培养权利要求 12 所述的转化体, 并由得到的培养物提取人、小鼠及大鼠基因编码的多肽。
14. 一种单克隆抗体, 它与权利要求 7-9 任一项所述的多肽特异性反应。
15. 一种多克隆抗体, 它与权利要求 7-9 任一项所述的多肽特异性反应。
16. 一种杂交瘤, 它通过融合用权利要求 7-9 任一项所述的多肽免疫的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞获得, 并产生权利要求 14 所述的单克隆抗体。
17. 一种检测试剂, 它含有权利要求 10 所述的寡核苷酸探针。
18. 一种诊断用试剂盒, 它含有权利要求 7-9 任一项所述的多肽、权利要求 14 所述的单克隆抗体和/或权利要求 15 所述的多克隆抗体。
19. 一种药物组合物, 它包括权利要求 7-9 任一项所述的多肽。
20. 一种药物组合物, 它包括权利要求 14 所述的单克隆抗体或权利要求 15 所述的多克隆抗体。

21. 一种药物组合物, 它包括与权利要求 1~6 所述的基因的一部分特异性杂交的反义寡核苷酸。
22. 一种药物组合物, 它包括含有权利要求 1~6 所述的基因的至少一部分的、可用于基因治疗的核酸。
- 5 23. 权利要求 1 或 4 所述的人基因, 其特征在于, 它存在于 X 染色体上。
24. 权利要求 7~9 所述的多肽, 其特征在于, 该多肽是细胞膜结合型。
25. 一种基因, 它编码权利要求 24 所述的细胞膜结合型多肽。
- 10 26. 权利要求 7~9 所述的多肽, 其特征在于, 该多肽具有血管新生抑制作用。
27. 一种基因, 它编码权利要求 26 所述的具有血管新生抑制作用的多肽。

新型多肽及其编码基因

技术领域

- 5 本发明涉及与已知调节软骨细胞的增殖、分化和具有血管新生抑制作用的软骨调节因子-I (Chondromodulin, ChM-I) 氨基酸序列具有同源性的新型的人、小鼠和大鼠多肽, 以及编码该多肽的人、小鼠和大鼠基因 (以下, 略作“ChMIL基因”)。

背景技术

- 10 哺乳类的大部分骨经过软骨细胞的增殖、分化, 发生钙质化, 最后置换为骨, 即经过所谓的“内软骨骨化”过程转化为骨。这一系列过程中有多种激素和生长因子参与, 例如已知有类胰岛素生长因子 (IGF1、IGF2)、成纤维细胞增殖因子 (FGF)、癌细胞增殖因子 (TGF)、生长激素等。开等分离纯化了上述激素和生长因子以外的具有促进软骨细胞增殖、分化功能的因子 ChM-I 基因 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 175, 971-977, 1991; 欧洲专利公开第 473080 号公报)。人 ChM-I 是由 334 个氨基酸残基构成的 II 型膜蛋白质, 糖链修饰后, 经加工并将由 120 个氨基酸残基构成的 C 末端部分分泌到细胞外 (Hiraki et al, Eur. J. Biochem. 260, 869-878, 1999)。ChM-I 不仅能
- 20 促进培养软骨细胞的增殖, 还能有效地促进蛋白质多糖的合成以及琼脂糖中的软骨细胞集落的形成 (Inoue et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 241, 395-400, 1997)。另外, ChM-I 不仅能够促进软骨细胞的增殖, 还可以促进成骨细胞的增殖 (Mori et al, FEBS Letters, 406 310-314, 1997)。
- 25 另一方面, 很早之前就已指出软骨不仅是无血管组织, 而且还对血管侵入具有抵抗性。开等尝试了从软骨组织提取物中纯化血管内皮细胞增殖抑制因子, 并在完全纯化方面获得了成功。结果表明, 该因子为 ChM-I (Hiraki et al, FEBS Letter, 415, 321-324, 1997; Hiraki et al, J. Biol. Chem., 272, 32419-32426, 1997)。软骨组织通常以保持无血管
- 30 状态为特征, 不过置换为骨组织时, 血管侵入软骨组织是必要的。形成初级骨化中心时, 在血管侵入之前, 预定的侵入区域产生软骨细胞的肥大化和软骨基质的钙质化。在肥大化软骨和随后的钙质化软骨出现区域, ChM-I 的表达急剧消失。即, ChM-I 基因表达具有软骨特异性, 但局限于表现血管侵入抵抗性的无血管软骨组织中。如上所述,
- 35 可推测 ChM-I 不仅能够促进软骨的增殖和分化成熟, 同时还通过抑

制血管内皮细胞的增殖而抑制血管侵入。因此, ChM-I 在无血管软骨中的表达和血管侵入之前在钙质化层中的表达消失, 与 ChM-I 的双重功能的作用是基本一致的。

- 此外, 已明确在软骨组织中, 强有力的血管新生促进因子 bFGF 大量蓄积在细胞外周质中, 而 ChM-I 围绕著 bFGF, 存在于 bFGF 的领域空间中 (Hiraki et al, J. Biol. Chem., 272, 32419-32426, 1997)。即, 在无血管软骨中, ChM-I 以包裹血管新生促进因子的形式存在, 进而由 ChM-I 的血管新生抑制作用可以解释软骨中无血管存在的现象 (蛋白质·核酸·酶 Vol.40 No.5, 1995)。此外, 已明确 ChM-I 在体内可抑制向人肿瘤细胞的血管侵入, 并可抑制癌细胞的增殖 (Hayami et al, FEBS Letters, 458, 436-440, 1999)。从小鼠各个组织中的 ChM-I mRNA 的表达分析结果来看, ChM-I 在软骨以外的眼和胸腺也有表达, 不过目前对 ChM-I 在这些组织中的功能还不了解 (Shukunami et al, Int. J. Dev. Biol. 43, 39-49, 1999)。

- 软骨细胞的增殖、分化机能的发挥在骨折治愈和各类软骨疾病的治愈过程中非常重要。因此, 作为促进软骨细胞的增殖和分化的因子, ChM-I 有望作为软骨细胞增殖剂而得到应用 (特开平 7-138295 号公报)。癌细胞在增殖、转移时为获得能量, 向组织内的血管侵入是必须的。因此, 具有血管新生抑制作用的 ChM-I 有望作为抗肿瘤剂而得到应用 (特开平 7-138295 号公报)。如上所述, ChM-I 是控制软骨细胞的增殖、分化的同时, 还具有血管新生抑制作用的分子。从其功能来看, ChM-I 有望作为医药品而得到应用。

- 近年来, 生物技术持续的迅速进步, 并随着人类基因组计划的进展, 大量的新型基因被克隆出来。人的基因据说大约有 10 万个, 其中, 氨基酸序列经确认具有同源性的分子组可形成蛋白质家族。氨基酸序列经确认具有同源性的分子组, 已知有 TNF 家族、TNF 受体家族、趋化因子以及 G 蛋白质偶联受体等多种基因家族。例如, 属于 TNF 家族的分子已知存在有肿瘤坏死因子 α (TNF α , Pennica et al, nature 312, 724, 1984)、Fas 配体 (FasL, Suda et al, Cell 75, 1167, 1993)、TNF-相关细胞凋亡诱导配体 (TRAIL, Steven et al, Immunity 3, 673, 1995) 以及 B 淋巴细胞刺激因子 (BLYS, Moore et al, Science 285, 260-263, 1999) 等大约 20 种。

- 属于 TNF 家族的分子是 II 型膜蛋白质, 其细胞外区域经确认具有氨基酸序列同源性, 这些分子虽然氨基酸序列已确认具有同源性, 但也明确了各个分子具有其固有的功能, 并且正在尝试着作为针对各种

不同疾病的医药品进行使用。此外，已明确 TNF 家族的分子存在各自固有的受体，也尝试了将这些受体作为医药品进行使用，而实际上也存在作为医药品得到了认可的受体（例如可溶性 TNF 受体，Immunex 公司）。此外，将针对这些分子的抗体作为医药品的研究开发也已展
5 开，而实际上也存在作为医药品得到了认可的抗体（例如抗 TNF α 抗体，Centocore 公司）。作为将氨基酸序列确认具有同源性的分子应用于医药品开发的例子，如可举出 TNF 家族及 TNF 受体家族。作为可将这些分子应用于医药品的前提条件，例如分析各个分子的功能，进而明确其类似性和差异性等。

10 此外，TNF 家族的分子是具 II 型膜蛋白质结构的分子，因为主要在血液系统、淋巴系统的细胞中进行表达的分子居多，所以在实验手法和材料方面有很多可共享的部分。进而，属于 TNF 家族的新型基因被发现时，其功能分析的速度与早期发现的分子相比更为迅速。这样，发现氨基酸序列具有同源性的新型基因，并对其功能进行分析，不仅
15 有助于今后发现的新型基因的功能分析，还可以将其分析结果与已知的分子进行比较，进而对已知分子的功能也可以得到更为详尽的认识。

通常，克隆了编码与已知分子确认具有氨基酸序列同源性的蛋白质的新型基因时，功能分析使用的技术和材料可以参考已知分子的例
20 子。可是，即使是氨基酸序列确认具有同源性的分子，如上述 TNF 家族，因为每个分子都有其固有的功能，在考虑作为医药品应用时，有必要明确重组蛋白质的表达和纯化，抗体的制备，各种组织中的 mRNA 及蛋白质的表达情况等，以及还需要明确与已知分子在结构和功能方面的差异。

25 发明内容

本发明的目的在于，提供类似于 ChM-I 的新型多肽及其编码基因。此外，本发明的目的还在于，制备针对该多肽的抗体，分析该基因及多肽在各种组织中的表达水平，表达重组蛋白质及结构分析等，并在明确与 ChM-I 的类似性及差异的同时，阐明功能，使与之相关疾
30 病的症状分析和诊断、治疗等成为可能。

ChM-I 是调节软骨细胞的增殖、分化，并具有血管新生抑制作用的 II 型膜蛋白质，并且是有望应用在医药品的分子。因此，如果能够
35 提供编码与 ChM-I 类似的新型多肽的基因，则可分析它在各种细胞中的表达水平以及它的结构和功能，并且通过分析其表达产物等，可使与之相关疾病的症状分析和诊断、治疗等成为可能。不过，目前对与

ChM-I的氨基酸序列显示同源性的分子还没有报道,并对ChM-I是否构成基因家族也尚未明确。因此,如果确定有与ChM-I类似的多肽及其编码基因存在,通过其结构及功能等的分析,则有可能探讨与ChM-I的类似性和差异性,并且才有望阐明相互分子的生理功能,以及加速与这些分子相关疾病的症状分析、诊断及治疗药的开发等。

基于上述目的,本发明人等反复进行了悉心研究,结果由人、小鼠及大鼠cDNA文库成功地分离出符合上述目的基因(ChM1L基因),并进行了其在各组织中的表达水平的分析,针对该多肽的抗体的制备,该基因编码的多肽在哺乳动物细胞中的表达、检测及纯化等,以及明确了该多肽具有血管新生抑制作用,从而完成了本发明。

即,本发明是编码实质上含有序列号2、4和6所示的氨基酸序列的多肽的基因。作为上述基因,例如序列号1、3和5所示的碱基序列。

本发明是实质上含有序列号2、4和6所示的氨基酸序列的,人、小鼠和大鼠的基因编码的多肽。

本发明是与上述基因的至少一部分杂交的寡核苷酸探针。

本发明是含有上述基因的重组DNA。

本发明是被上述重组DNA转化的转化体。

本发明是一种制备上述多肽的方法,其特征在于,培养上述转化体,从得到的培养物中提取本发明基因编码的多肽。

本发明是与上述多肽特异反应的单克隆抗体或多克隆抗体。

本发明是生成上述单克隆抗体的杂交瘤,该杂交瘤通过将用上述多肽免疫的抗体生成细胞和骨髓瘤细胞进行融合获得。

本发明是含有上述寡核苷酸探针的基因检测试剂。

本发明是含有上述多肽、以及上述单克隆抗体或多克隆抗体的诊断试剂盒。

本发明是一种医药组合物,该组合物包括实质上含有序列号2、4或6所示的氨基酸序列的基因编码的多肽。

本发明是一种医药组合物,该组合物包括与上述多肽特异反应的单克隆抗体或多克隆抗体。

本发明是一种医药组合物,该组合物包括与上述基因的一部分特异反应的反义寡核苷酸。

本发明是一种医药组合物,该组合物包括含有上述基因的至少一部分的、可用于基因治疗的核酸。

本发明是一种多肽,其特征在于,上述多肽是细胞膜结合型。

本发明是编码上述细胞膜结合型多肽的基因。

本发明是一种基因,其特征在于,上述人基因存在于X染色体。
本发明是一种多肽,其特征在于,上述多肽具有血管新生抑制作用。

本发明是编码具有上述血管新生抑制作用的多肽的基因。

5 附图的简单说明

图 1A 表示人 ChMIL 和人 ChM-I 的氨基酸序列同源性的比较结果。

图 1B 表示人、小鼠和大鼠 ChMIL 的氨基酸序列同源性的比较结果。

10 图 2 表示人 ChM-I、人 ChMIL 和小鼠 ChMIL 的氨基酸序列的疏水性示意图。

图 3 表示小鼠成熟个体和胎儿的各组织中 ChMIL mRNA 的表达分析结果,以及在小鼠胎儿形成阶段中 ChMIL 和 ChM-I mRNA 的表达分析结果。

15 图 4 表示在 COS7 细胞表达人和小鼠 ChMIL 蛋白质,并由蛋白质印迹 (Western blot) 进行检测的结果。(a) 表示分子量标准 (Mock, 泳道 1), 转染人 ChMIL (泳道 2) 和小鼠 ChMIL (泳道 3) 并将细胞成分进行电泳后,经考马士亮蓝染色的结果,(c) 表示将同一样品用抗 ChMIL 肽抗体并由蛋白质印迹进行检测的结果。(b) 表示分子量
20 标准 (泳道 1), 转染人 ChMIL (带有 His 标记) (泳道 2) 和小鼠 ChMIL (带有 His 标记) (泳道 3) 并将细胞成分电泳后,经考马士亮蓝染色的结果,(d) 表示将同一样品用抗 His 标记抗体并由蛋白质印迹进行检测的结果。

25 图 5 表示在 COS7 细胞表达的可溶性 ChMIL (泳道 2) 和 Mock (泳道 1) 用 FLAG M2 抗体并由蛋白质印迹进行检测的结果。

图 6 表示在 COS7 细胞表达小鼠 ChMIL (带有 His 标记) 蛋白质,回收细胞成分并进行糖链消化反应后,用抗 His 标记抗体并由蛋白质印迹检测 ChMIL 蛋白质,对糖链结构进行分析的结果。泳道 1 为未处理,泳道 2 为经 NANaseII+O-糖苷酶 DS+PNGase 处理,泳道 3 为经
30 NANaseII 处理,泳道 4 为经 O-糖苷酶 DS 处理,泳道 5 为经 PNGase 处理的样品的蛋白质印迹结果。

图 7 表示对小鼠肋软骨组织中的 ChMIL 蛋白质的表达,用抗 ChMIL 多肽抗体并由免疫染色进行检测的结果。

35 图 8 表示对在 COS7 细胞培养液中表达的可溶性人 ChMIL 蛋白质,用抗 FLAG M2 亲和胶并由亲和层析纯化,电泳后用考马士亮蓝染

色的结果。泳道1为COS7细胞的培养上清,泳道2为纯化后的ChM1L蛋白质的电泳结果。

图9表示人脐带静脉内皮细胞的微管结构形成体系用(a)缓冲液, (b)20 μ g牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), (c)10 μ g可溶性人ChM1L, (d)20 μ g可溶性人ChM1L, (e)1 μ g血小板因子4(platelet factor 4, PF-4), (f)10 μ g血小板因子4处理后的结果。

实施发明的方案

本发明中,“实质上含有”是指本发明的基因或多肽在保持其功能的范围内,序列号1、3或5所示的碱基序列,或序列号2、4或6所示的氨基酸序列可以发生置换、插入或缺失等变异。

本发明的ChM1L基因序列可由RACE(Rapid amplification of cDNA ends, cDNA 末端快速扩增; Frohman, M.A. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1998)法得到, RACE法的概要如下所述。

通常, RACE法是已知cDNA的部分序列时,以此为基础,高效获得全长cDNA的方法。设计可使扩增反应从已知序列区域分别向3'末端或5'末端方向延伸的引物,通过PCR(Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链反应; Science, 230, 1350-1354, 1985)法扩增cDNA。实施PCR法时,在已知区域应用特异配对的引物,在3'末端和5'末端应用与通过连接反应等附加的序列配对的引物。因此,通过PCR法扩增的区域含有序列未知的区域。如在后述的实施例叙述的那样, DNA扩增片断的分离纯化可采用常规方法,例如可以采用凝胶电泳等。由此获得的双脱氧法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977)或Maxam-Gilbert法(Methods in Enzymology, 65, 499, 1980)等进行测定。有关碱基序列的测定也可以利用市售的测序试剂盒等很容易地进行。

在本发明后述的实施例2中虽有更为具体的详细叙述,但其大致概要如下所述。由人ChM-I的氨基酸序列,在日本DNA数据库(DBJ: DNA data bank of Japan)中,用EST数据库(dbEST, EST: Expressed sequence tag)进行TBLASTN检索,检索出EST档案中基因库登记编号为A1123839的序列。A1123839是登记在dbEST的碱基序列片断,由上述TBLASTN检索,首次明确它是编码类似ChM-I的氨基酸序列的新型基因片断。于是,以该dbEST得到的cDNA部分序列为基础合成引物,用RACE法完成了对人ChM1L基因的序列测定。之后,同

样测定了小鼠及大鼠 ChMIL 基因的序列。人、小鼠及大鼠 ChMIL 基因的序列分别示于序列号 1、3 及 5，其编码的多肽的氨基酸序列分别示于序列号 2、4 及 6。

本发明的 ChMIL 基因编码的多肽由 317 个氨基酸构成(序列号 2、4 及 6)。ChMIL 的氨基酸序列与 ChM-I 具有同源性，特别是与 ChM-I 经加工后分泌于细胞外的 C 末端部分具有高度同源性(图 1(a))。另外，ChMIL 的氨基酸序列在人、小鼠和大鼠之间具有高度的同源性(图 1(b))。从氨基酸序列的疏水程度的分析结果来看，ChMIL 与 ChM-I 相同，是具有 II 型膜蛋白质结构的分子(图 2)。如图 2 所示，该多肽和 ChM-I 均在 N 末端的数十个氨基酸附近存在膜结合分子特征性的由约 20 个氨基酸组成的疏水性区域。该多肽为具有 II 型膜蛋白质结构的分子，也可以由将该多肽在 COS7 细胞中进行表达的实施例 8 的结果加以确认(图 4)。

如后述的实施例 12 所述，可以确认本发明的人 ChMIL 基因存在于人 X 染色体上(基因库登记编号 AL035608)。

本发明的 ChMIL 基因包括 cDNA、化学合成的 DNA、通过 PCR 分离的 DNA、基因组 DNA 及它们的组合。该基因组 DNA 可以使用标准方法，通过形成针对本说明书中公开的 ChMIL 基因的杂交子进行分离。本发明还包括由该 ChMIL 基因转录的 RNA。序列号 1、3 及 5 所示本发明的基因序列是与该基因编码产物各氨基酸残基对应的密码子的组合例之一，本发明的 ChMIL 基因不局限于此，也可以具有将与各氨基酸残基对应的任一密码子进行选择并组合的 DNA 序列。该密码子的选择可以按照常规方法，例如可以考虑所用宿主的密码子使用频率(Nucleic Acids Research, 9,43-74,1981)。

本发明的 ChMIL 基因还包括序列号 2、4 和 6 所示的氨基酸序列中一部分产生置换、缺失、添加的变异体的编码 DNA 序列。这些多肽的制备以及修饰(变异)等即可以通过天然产生的，也可以通过翻译后修饰或者基因工程方法，例如定点诱变(Methods in Enzymology, 154, 350,367-382,1987; 同 100,468,1983; Nucleic Acids Research, 12, 9441, 1984; 续生物化学试验讲座 1 “基因研究方法 II”，日本生物化学会编，105,1986)等方法获得。

本发明的 ChMIL 基因的制备，以本发明 ChMIL 基因的序列信息为基础，可通过常规的基因工程方法很容易地进行(参照《分子克隆》第二版，冷泉港实验室编著，1989; 续生物化学实验讲座“基因研究方法 I、II、III”，日本生物化学会编，1986 等)。

例如由 cDNA 文库 (由表达 ChMIL 基因的适当的起源细胞, 通过常规方法制备), 使用本发明基因特有的适当的探针和抗体, 通过筛选所希望的克隆制备 ChMIL 基因 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6613, 1981; Science, 222, 778, 1983 等)。

- 5 在上述方法中, 作为起源细胞, 例如表达 ChMIL 基因的各种细胞, 组织或组织来源的培养细胞。这些细胞的总 RNA 分离, mRNA 的分离和纯化, cDNA 的转换 (合成) 及其克隆均可以按照常规方法进行。此外, cDNA 文库已有市售的商品。本发明中, 这些 cDNA 文库例如也可以使用 CloneTech 公司制的各种 cDNA 文库等。

- 10 由 cDNA 文库筛选本发明的 ChMIL 基因, 例如可以按照上述常规方法进行。作为这种筛选方法, 例如针对 cDNA 产生的多肽, 用本发明 ChMIL 基因编码的多肽的特异性抗体, 免疫筛选相对应的 cDNA 克隆的方法; 用选择性结合目的碱基序列的探针进行噬菌斑杂交的或菌落杂交的方法等; 以及这些方法的组合。作为在此使用的探针, 例如以本发明 ChMIL 基因的 DNA 序列的相关信息为基础, 化学合成的 DNA 序列; 已经获得的本发明 ChMIL 基因或其片断。

- 15 此外, 制备本发明的 ChMIL 基因时, 优选利用 PCR 法的 DNA/RNA 扩增法。采用上述 PCR 法时, 使用的引物可以将已由本发明确定的 ChMIL 基因序列信息作为基础, 适宜进行设计, 并用常规方法进行合成。

- 20 实施例 2 中虽有更为具体的详细叙述, 但其大致概要如下所述。合成含有 ChMIL 基因编码序列的引物, 利用该引物并通过 PCR 法扩增 ChMIL 基因。然后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 切出目的条带后, 纯化 DNA。将纯化的 DNA 和质粒载体进行连接, 并转化大肠杆菌。然后, 由大肠杆菌的培养液纯化质粒, 通过 DNA 测序确认是否插入了目的序列。由此克隆的 ChMIL 基因, 通过使用适当的限制性内切酶, 可以转移到其它质粒载体中或和病毒载体中。

- 25 利用由此得到的 ChMIL 基因 (cDNA 和基因组 DNA), 按照常规方法, 可以制作 ChMIL 基因的表达增加、减弱以及消失的转基因动物。

- 30 以本发明的 ChMIL 基因的序列信息为基础, 通过利用该基因的一部分或全部碱基序列, 可以检测本发明的 ChMIL 基因在各种组织中的表达。这可以按照常规方法进行, 例如 RT-PCR (反转录-聚合酶链反应) (Kawasaki, E.S., et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., Sandiego, 21-

27,1989)法, Northern 印迹分析(《分子克隆》, 冷泉港实验室, 1989)等均可以得到良好的效果。RT-PCR 法的引物和的 Northern 印迹分析的探针, 只要是可特异性检测出 ChMIL 基因的序列即可, 对此没有特殊的限定, 有关序列可以本发明 ChMIL 基因的碱基序列为基础, 适宜地进行设计。进而, 本发明还提供用于检测 ChMIL 基因的引物和/或探针。此外, 该探针还可以应用在通过 Southern 印迹分析检测基因组 DNA 的过程。

作为检测 ChMIL mRNA 的表达的手段, 例如实施例 6 中所述的 RT-PCR 法。详细情况虽在实施例 6 中有所叙述, 但大致概要如下所述。

摘除各组织并提取 RNA 后, 通过反转录反应合成 cDNA。将此 cDNA 作为模板, 进行 PCR 反应, 得到的反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 在紫外照射下观察条带, 进而检测各组织中 ChMIL 基因的表达量。结果表明, 成熟小鼠个体的各组织中, 在脑、眼球、骨骼肌、肋骨和甲状腺中有 ChMIL mRNA 的表达(图 3(a))。另一方面, 可以确认 ChM-I mRNA 表达于小鼠的眼球、胸腺、软骨及肋骨中(Shukunami et al, Int. J. Dev. Biol 43,39-49,1999)。由此, 可以明确 ChMIL 和 ChM-I 在生物体内的不同组织中进行表达, 进而可以认为其生理功能有所不同。此外, 可以确认 ChMIL 在未发现有 ChM-I 表达的组织, 如脑、骨骼肌及甲状腺中有所表达。

此外, 由于 ChMIL 可在表达 ChM-I 且对血管侵入具有抵抗性的组织, 如眼球和包括软骨在内的肋骨中表达, 因此可以认为 ChMIL 参与了血管新生的过程。由这些结果进而可以认为, ChMIL 与阿耳茨海默病等脑相关疾病、肌肉萎缩症等骨骼肌相关疾病、甲状腺机能亢进病等甲状腺相关疾病、糖尿病性视网膜病等眼球相关疾病、变形性关节炎和风湿性疾病等软骨组织相关疾病、以及包括癌症在内的血管新生相关疾病有关。由此, 可以认为本发明的 ChMIL 基因、ChMIL 多肽、包括与 ChMIL 结合的抗体在内的 ChMIL 对抗物和刺激物、促进或减弱 ChMIL 表达的物质等可用作这些疾病的治疗药。此外, 这里所说的对抗物和刺激物等物质可以是肽、蛋白质及低分子化合物等, 只要具有上述功能, 就对物质的性状没有限定。

已经确认 ChMIL mRNA 在胎儿的各组织, 如眼球、肾脏、胃、肋骨及气管中表达(图 3(b))。成熟小鼠个体中未发现 ChMIL mRNA 在肾脏和胃中表达, 而在胎儿的这些组织中则有 ChMIL mRNA 的表达, 因此认为 ChMIL 与这些脏器的发育以及形态形成有关。进而认

为,在成熟个体中 ChM1L 也可能参与这些脏器的修复和再生。另外,已经明确在气管中也有 ChM1L mRNA 的表达。因此,本发明的 ChM1L 基因、ChM1L 多肽、包括与 ChM1L 结合的抗体在内的 ChM1L 对抗物及刺激物、促进和减弱 ChM1L 基因表达的物质等,有可能用作慢性肾功能衰竭等肾脏相关疾病、胃癌或胃溃疡等胃相关疾病、以及慢性支气管炎和哮喘等气管相关呼吸系统疾病的治疗药。

在胎儿发育阶段,ChM1L mRNA 的表达在妊娠第 10 天非常弱,第 11 天到第 13 天表达量上升(图 3(c))。另一方面,ChM-I 也与 ChM1L 相同,随着胎儿的发育,表达量上升,但在妊娠第 10 天以及第 11 天,明显表现出比 ChM1L 有更强的表达。在胎儿的发育阶段,ChM1L 比 ChM-I 更晚出现表达上升,说明两种分子在胎儿发育时具有不同的功能。此外,在胎儿的发育阶段,ChM1L 的表达上升,说明 ChM1L 与脏器和骨骼的形成密切相关。进而,本发明的 ChM1L 基因、ChM1L 多肽、包括与 ChM1L 结合的抗体在内的 ChM1L 对抗物及刺激物、促进和减弱 ChM1L 基因表达的物质等有可能作为脏器发育不全导致的先天疾病的治疗药,以及在后天性脏器损伤时作为再生及修复脏器的药物使用。此外,ChM1L 和 ChM-I 在成熟个体及胎儿各组织中的表达,以及在胎儿发育阶段的表达有所差异,因此将这些分子以及这些分子的前药作为各种疾病的治疗药使用时,其用途有可能会

有差异。

利用本发明的 ChM1L 基因的序列,能够通过基因工程方法制备该基因编码的多肽。

该多肽的制备,可以通过制备可在宿主细胞中表达本发明 ChM1L 基因的重组 DNA,将该重组 DNA 导入宿主细胞进行转化,培养该转化体来进行。

此时,作为宿主细胞,真核宿主细胞和原核宿主细胞均可以使用。

该真核宿主细胞包括脊椎动物、酵母及昆虫细胞等。作为脊椎动物细胞,例如 CHO 细胞及 COS 细胞等。

作为脊椎动物的表达载体,通常可以使用具有位于表达基因的上游的启动子、多聚腺苷化位点及转录终止序列等的载体。作为该表达载体,例如具有 SV40 早期启动子的 pSV2dhfr (Mol. Cell. Biol., 854, 1981), pcDNA3.1(+) (Invitrogen 公司)及 pCAGGS (Gene, 108, 193-200, 1991)等。

在真核细胞中表达目的基因的方法,在该领域中众所周知有多种体系。

例如,作为在酵母中的表达体系,例如特开昭 57-159489 号公报中记载的“酵母中多肽的表达”;作为在昆虫细胞中的表达体系,例如特开昭 60-37988 号公报中记载的“重组杆状病毒表达载体的制备方法”;作为在哺乳动物细胞中的表达体系,例如特开平 2-171198 号公报中记载的“真核表达的改良”;当然除此以外还存在很多种体系。

本发明的 ChM1L 基因,例如也可以在大肠杆菌、枯草杆菌及链霉菌等原核宿主细胞中表达。例如,作为上述宿主的大肠杆菌,通常使用大肠杆菌 K12 株等;作为载体,通常使用 pBR322 及其改良载体,但不局限于此,也可以利用众所周知的各种菌株及载体。作为启动子,例如大肠杆菌乳糖启动子(lac)、大肠杆菌 trp 等启动子,但不限于此,上述启动子均已特性化,并为业内人士所熟知,这些启动子可以通过合成获得,也可以由已知的载体构建。

本发明的例示 DNA 序列、质粒及病毒可以进行多种修饰和改变。例如,可根据遗传密码的简并性,在多肽的密码区域范围内进行核苷酸的置换,这种序列可由本发明 ChM1L 基因的碱基序列或由其编码的多肽的氨基酸序列推测出来,并通过下述以往的合成方法进行构建。这种合成方法基本上可按照 Itakura 等人的方法(Itakura et al, Science 198,1059,1997)以及 Crea 等人的方法(Crea et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5765, 1978)进行。因此,本发明并不局限在特意例示的碱基序列、质粒及病毒。

将由此得到的本发明的目的重组 DNA 导入宿主细胞的方法以及转化方法,可采用常规的各种方法。得到的转化体可按照常规方法进行培养,并通过该培养生产本发明 ChM1L 基因编码的多肽。作为用于该培养的培养基,可根据采用的宿主细胞,适宜选择惯用的各种培养基,其培养也可以在适于宿主细胞繁殖的条件下进行。

经过上述过程,在转化体的细胞内、细胞外或细胞膜上生成该多肽。该多肽可根据需要,通过利用其物理性质、化学性质等的各种分离操作[参照“生物化学数据手册 II”,1175-1259 页,第 1 版第 1 次印刷,1980 年 6 月 23 日株式会社东京化学同人发行;Biochemistry, 25(25), 8274-8277(1986); Eur. J. Biochem., 163, 313-321(1987)等]进行分离纯化。作为该方法,具体而言,例如通常的重构建处理、多肽沉淀剂处理(盐析法)、离心分离、渗透压破碎法、超声波破碎、超滤、凝胶过滤,以及吸附色谱、离子交换色谱、亲和色谱、高速液相色谱(HPLC)等各种液相色谱,透析法及这些方法的组合等。此外,通过表达该多肽与亲合标记融合的蛋白质,利用该标记可以进行亲合纯

化。此处所述的亲合标记，例如多聚组氨酸标记（His 标记，Sisk et al, J. Virol. 68,766,1994）及 FLAG 标记（Hopp et al, Biotechnology 6,1204-1210,1988）。与这些亲合标记融合的 ChMIL 多肽的表达及检测，可按照实施例 8 和 9 所述的方法进行，利用这些标记也可以进行 ChMIL 多肽的纯化。

对于本发明 ChMIL 基因编码的多肽的制备方法，实施例 8 中虽有更为具体的详细叙述，但大致概要如下所述。

将本发明的人和小鼠 ChMIL 基因以及 C 末端融合有 His 标记的 ChMIL 蛋白质的编码基因克隆到 pcDNA3.1(+)载体中（实施例 4），并用得到的载体转染 COS7 细胞。约 48 小时后，回收培养上清及细胞成分，通过蛋白质印迹法进行 ChMIL 重组蛋白质的检测。但由培养上清及细胞成分均未检测到 ChMIL 蛋白质的表达。

因此，对于检测 ChMIL 融合蛋白质表达的条件进行了研究，结果通过使用 pCAGGS 作为表达载体，使 COS7 细胞中该多肽表达的检测成为可能。将本发明的人和小鼠 ChMIL 基因以及 C 末端融合有 His 标记的 ChMIL 蛋白质的编码基因克隆到 pCAGGS 载体（实施例 4），并用得到的载体转染 COS7 细胞。约 48 小时后，回收培养上清以及细胞成分，并通过蛋白质印迹法进行 ChMIL 重组蛋白质的检测。在培养上清中未检测到有 ChMIL 蛋白质的表达，但在细胞成分中检测到在 40kDa 附近有两个条带。

由此，可以明确 ChMIL 蛋白质是膜结合性蛋白质。另一方面，在 COS7 细胞中表达 ChM-I 时，可以确认 ChM-I 作为可溶性蛋白质分泌表达在培养上清中（Hiraki et al, J. Biol. Chem., 272, 32419-32426, 1997）。通过对在 COS7 细胞中表达情况进行分析，可以确认 ChMIL 和 ChM-I 是具有不同结构的蛋白质。即，可明确 ChMIL 是细胞膜结合型的蛋白质，ChM-I 是分泌型的蛋白质，并且两个分子具有不同的加工机制。此外，在 ChMIL 蛋白质的两个条带中，高分子量的条带是被 N 结合型的糖链修饰的形式，这可由后述实施例 10 加以明确（图 6）。

由上述方法表达的 ChMIL 蛋白质，可以利用 ChMIL 特异的抗体或针对融合 6 个组氨酸残基的标记（His 标记）等的抗体以及镍柱等进行亲合纯化。

本发明的 ChMIL 基因编码的多肽可以是膜结合性多肽，也可以是不具备膜结合性的可溶性多肽。例如，作为膜结合性多肽表达在细胞膜上后，经切断有可能转换为可溶性的多肽等。在 COS7 细胞中表达时，ChMIL 蛋白质经检测为膜结合型的蛋白质（实施例 8），但宿主

细胞和培养条件等变化时,经加工有可能转变为可溶性蛋白质。而缺少跨膜区域的可溶性的该多肽,可以在N末端融合异源信号肽后进行表达。

- 5 实施例9中有更为具体的详细叙述,但可溶性ChMIL蛋白质表达方法的大致概要如下所述。

构建在pCAGGS载体的N末端整合了融合前胰岛素原信号序列、FLAG标记、ChMIL细胞外区域的C末端的蛋白质编码碱基序列的载体(实施例5)。使用该载体表达的ChMIL蛋白质,前胰岛素原的信号肽被切断后,成为可溶性蛋白质分泌到培养液中(实施例9,图5)。

- 10 分泌到培养液中的可溶性ChMIL多肽,用抗ChMIL抗体,或者因为融合有FLAG标记,可以使用抗FLAG抗体(Sigma公司)进行纯化。此外,通过用肠激酶切断FLAG融合蛋白质,可以除去FLAG标记。

- 15 实施例13中虽有更为具体的详细叙述,但可溶性ChMIL蛋白质纯化方法的大致概要如下所述。

使用脂转染试剂(GIBCO BRL公司)并按照产品说明书,将pSF-shChMIL转染到COS7细胞中,约48小时后,回收培养上清。从此培养上清,用抗FLAG M2亲和胶(Sigma公司)进行亲和层析,纯化可溶性的人ChMIL蛋白质(图8)。

- 20 本发明的ChMIL多肽可以用作多肽纯化试剂。结合于固体支持材料的该多肽,可通过亲和层析纯化可以结合该多肽的多肽。作为能够结合ChMIL多肽的多肽,例如可溶性多肽、膜结合性多肽及抗体等。可溶性的ChMIL多肽适于体外添加到细胞培养液中,以及体内的静脉给药等。

- 25 为了检测本发明ChMIL多肽的活性,利用人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs)分析了有无血管新生抑制作用。后述的实施例14中有详细的描述,而大致概要如下所述。将HUVECs在涂布母胶(BECTON DICKINSON)的平板上进行培养时,血管内皮细胞形成微管结构(图9)。在该培养液中添加用上述的亲和层析纯化的ChMIL多肽时, HUVECs的微管结构的形成受到抑制(图9)。由此,可以明确ChMIL具有血管新生抑制作用,并且也可明确可溶性的ChMIL多肽适于作为糖尿病性视网膜病、类风湿性关节炎等与血管新生有关的疾病的治疗药使用。
- 30

- 可以用本发明的ChMIL基因编码的多肽制备特异性抗体。此时所使用的抗原是根据上述基因工程手段大量生产的多肽或化学合成的多
- 35

肽,得到的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体,这些抗体可以有效地用于该多肽的纯化、测定、标识等。因此,针对该多肽的多克隆抗体及单克隆抗体可用于该多肽(直接或者间接)介导的疾病的治疗以及治疗方法的开发,也可以作为上述疾病的诊断试剂应用。

5 与本发明 ChMIL 基因编码的多肽特异结合的抗体,可按实施例 7 所示进行制备。制备的抗 ChMIL 多肽抗体与该多肽的特异性结合,可以由实施例 8 的蛋白质印迹结果进行确认(图 4)。

10 抗 ChMIL 多肽抗体也可以如实施例 11 所示,用于组织切片的免疫染色。用抗 ChMIL 多肽抗体对软骨组织进行染色时,包围在软骨组织周围并呈现成纤维细胞样的扁平形态的细胞被特异性的染色(图 7)。另一方面,ChM-I 特异表达在软骨细胞,通过免疫染色可以明确蓄积在软骨细胞以及软骨细胞外的基质中(Hiraki et al, J. Biol. Chem., 272, 32419-32426, 1997)。由此,可以明确在包括软骨在内的组织中,ChMIL 和 ChM-I 表达于不同细胞中。进而,可以明确 ChMIL 和 ChM-I 是具有不同功能的分子。

15 含有通过免疫染色明确表达 ChMIL 蛋白质并呈现成纤维细胞样形态的细胞群的组织,以往称为软骨膜(perichondrium)(Suda et al, 骨形成和骨吸收以及它们的调节因子 1、2, 1995)。对于所谓软骨膜的组织,目前尚没有明确的定义,在本说明书中指的是含有包围在软骨细胞周围并显示成纤维细胞样形态的细胞的组织。

20 存在于软骨膜的细胞在内软骨性骨化过程中,是软骨组织成长时的软骨细胞的供给源。因此,软骨膜是在发育过程中的骨骼形成和成体中骨、软骨损伤时供给软骨细胞的重要组织。软骨组织的特征在于不存在血管、神经、淋巴管,而由于软骨膜存在于软骨组织和其他组织的交界处,因此认为软骨膜能够控制血管、神经、淋巴管向软骨组织的侵入。类似于此,可以认为软骨膜是重要的组织,但不是如上所述的一些有明确定义的组织,对此目前也尚未进行详细的研究。作为其原因,例如尚未完全明确软骨膜特异表达的分子。

25 进而,如果可以明确包围在软骨组织周围的、所谓软骨膜的组织有特异表达的分子,则该分子可以作为重要的工具用于软骨膜以及软骨组织的研究。

本发明的 ChMIL 是已明确的软骨膜特异表达的唯一分子,并认为该 ChMIL 可以控制血管、神经、淋巴管向软骨组织的侵入。

30 因此,ChMIL 基因的表达和本发明所包含的 ChMIL 功能的分析结果,为今后包括软骨膜以及软骨组织在内的、与表达 ChMIL 的其它

组织相关的病因研究和治疗方法开发提供了一种新的观点。

因此,本发明的 ChMIL 基因、ChMIL 多肽、包括结合 ChMIL 的抗体在内的 ChMIL 对抗物及刺激物、促进或者减弱 ChMIL 基因表达的物质等,可以适用于与表达上述 ChMIL 的细胞相关的疾病的治疗药。

由上述 mRNA 的表达分析以及免疫染色的结果,明确了本发明的 ChMIL 基因及其编码的多肽表达于脑、眼球、骨骼肌、甲状腺、包括软骨在内的肋骨、肾脏、胃、气管以及包围在软骨组织周围并显示成纤维细胞样扁平形态的细胞。因此,可以认为本发明的 ChMIL 基因及其编码的多肽与表达它们的上述组织相关疾病,例如糖尿病性视网膜病、肌肉萎缩症、甲状腺机能亢进、慢性肾功能衰竭、胃痛、慢性支气管炎、变形性关节炎以及类风湿性疾病等相关。

进而,认为本发明的 ChMIL 基因、ChMIL 多肽、包括结合 ChMIL 的抗体在内的 ChMIL 对抗物及刺激物、促进或者减弱 ChMIL 基因表达的物质等,可以适用于上述疾病的治疗药。

实施例

以下,结合实施例更为具体地说明本发明,但本发明的范围不限于这些实施例。

实施例 1. ChMIL 氨基酸序列的分析

对 ChMIL 和 ChM-I 的氨基酸序列的同源性进行了比较(图 1(a))。氨基酸序列用字母表 1 文字表示。虽然 ChMIL 整个分子与 ChM-I 具有同源性,但已明确与 ChM-I 经加工后分泌在细胞外的 C 末端具有高度的同源性。

对人、小鼠以及大鼠的 ChMIL 的氨基酸序列的同源性进行了比较(图 1(b))。ChMIL 多肽在人、小鼠以及大鼠中均由 317 个氨基酸构成。三者之间有 300 个氨基酸是相同的(约 95%)。

图 2 示出了 ChM-I 和 ChMIL 的疏水性。ChM-I 以及 ChMIL 的 N 末端均出现了疏水性的大峰。这种疏水性区域是细胞膜结合型的蛋白质的特征,这说明 ChM-I 和 ChMIL 同样,是 II 型膜结合性蛋白质。

实施例 2. ChMIL 基因的克隆

由日本 DNA 数据库(DDBJ: DNA data bank of Japan),利用人 ChM-I 的氨基酸序列(基因库登记编号 M16441),在表达序列标记数据库(dbEST)中进行 TBLASTN 检索。其结果,检索出 EST 文档中基因文库登记编号为 A1123839 的、和 ChM-I 具有同源性的新型基因片段。

使用 CloneTech 公司制的 Human fetus Marathon-Ready™ cDNAb, 并按照产品说明书, 用 RACE 法进行 cDNA 的扩增。根据由上述 dbEST 得到的碱基序列合成引物, 按照产品说明书使用 ExTaq 聚合酶(宝酒造), 采用 GeneAmp® PCR 系统 9700 (PE Applied Biosystems 公司), 反应循环为 96℃ 30 秒, 60℃ 30 秒, 72℃ 1 分钟, 共进行 30 个循环, 最后于 72℃ 保温 6 分钟, 得到 PCR 反应液, 在此反应液中按 1/10 量添加模板, 于相同条件进行 2 次 PCR。

得到的 PCR 产物用加入溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 通过在紫外线下观察该凝胶研究 DNA 条带。从凝胶中切出扩增的片段, 使用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 公司) 并按照产品说明书进行纯化。

纯化片段的碱基序列使用 PE Applied Biosystems 公司制的 DNA 测序仪 (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer) 以及 ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, 并按照产品说明书进行测定。

人 ChM1L cDNA 的核酸碱基序列示于序列号 1, 氨基酸序列示于序列号 2。

由于序列号 1 所示的人 ChM1L 基因编码的氨基酸序列与 ChM-I 具有同源性, 因此将此基因称为 ChM1L 基因 (ChM-I like gene)。

通过 PCR 扩增人 ChM1L cDNA 的编码序列 (CDS), 琼脂糖凝胶电泳后进行纯化, 使用 pCR-Script™ Amp 克隆试剂盒 (Stratagene 公司) 并按照产品说明书进行克隆。PCR 所用的引物序列示于序列号 7 (正向引物) 和序列号 8 (反向引物)。整合到载体中 ChM1L 基因序列, 用 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems 公司) 和 ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 并按照产品说明书进行测序。

用人 ChM1L 氨基酸序列 (序列号 2), 与上述人的情况同样, 进行 TBLASTN 检索。其结果, 检索出 EST 文档中基因库登记编号为 AV009191 的编码小鼠 ChM1L 的基因片断, EST 文档中基因库登记编号为 A1112003 的编码大鼠 ChM1L 的基因片断。用 CloneTech 公司制的 Mouse 11-day Embryo Marathon-Ready™ cDNA 以及 Rat Skeletal muscle Matathon-Ready™ cDNA, 与分离人 ChM1L 基因时同样, 通过 RACE 法测定小鼠和大鼠 ChM1L 基因序列。

小鼠 ChM1L cDNA 的核酸碱基序列如序列号 3 所示, 氨基酸序列如序列号 4 所示。大鼠 ChM1L cDNA 的核酸碱基序列示于序列号 5,

氨基酸序列示于序列号 6。

- 通过 PCR 扩增小鼠和大鼠 ChMIL cDNA 的编码序列 (CDS)，琼脂糖凝胶电泳后进行纯化，用 pCR-ScriptTMAmp 克隆试剂盒 (Stratagene 公司) 并按照产品说明书进行克隆。小鼠基因的 PCR 使用的引物序列如序列号 9 (正向引物) 和序列号 10 (反向引物) 所示，大鼠基因的 PCR 使用的引物序列如序列号 11 (正向引物) 和序列号 12 (反向引物) 所示。整合到载体的 ChMIL 基因序列按照产品说明书，使用 ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems 公司) 和 ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 进行测序。

整合本实施例构建的人、小鼠和大鼠 ChMIL 基因的载体用以下略称表示。

- 含有人 ChMIL 基因的载体: pCR-hChMIL
- 含有小鼠 ChMIL 基因的载体: pCR-mChMIL
- 含有大鼠 ChMIL 基因的载体: pCR-rChMIL

实施例 3. 含有 C 末端融合 6 个组氨酸残基的人以及小鼠 ChMIL 蛋白质的编码基因的载体的构建

- 通过 PCR 扩增人和小鼠 ChMIL cDNA 编码区 (CDS)，琼脂糖凝胶电泳后进行纯化，用 pCR-Script SK (+) 载体 (Stratagene 公司) 和 pCR-ScriptTMAmp 克隆试剂盒 (Stratagene 公司) 并按照产品说明书进行克隆，其中，对 pCR-Script SK (+) 载体进行了改良，以便在表达蛋白质的 C 末端融合 6 个组氨酸残基 (His 标记)。人基因的 PCR 中所用的引物序列如序列号 7 (正向引物) 和序列号 13 (反向引物) 所示，小鼠基因的 PCR 中所用的引物序列如序列号 9 (正向引物) 和 14 (反向引物) 所示。对 ChMIL 的 C 末端融合 His 标记的蛋白质的编码碱基序列是否整合进载体，可用 ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems 公司) 和 ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 并按照产品说明书加以确认。C 末端融合 His 标记的人和小鼠 ChMIL 的氨基酸序列分别如序列号 17 和 18 所示，其编码核酸碱基序列分别如序列号 15 和 16 所示。

整合本实施例构建的融合 His 标记的人、小鼠和大鼠 ChMIL 蛋白质编码基因的载体用以下略称表示。

- 含有融合 His 标记的人 ChMIL 蛋白质编码基因的载体: pCR-hChMILHis
- 含有融合 His 标记的小鼠 ChMIL 蛋白质编码基因的载体: pCR-

mChMILHis

实施例 4. 表达载体的构建

以在哺乳动物细胞中表达 ChMIL 基因为目的, 从上述 pCR - hChMIL、pCR - mChMIL、pCR - hChMILHis 以及 pCR - mChMILHis 载体中, 用限制性内切酶 EcoRI 和 NotI 切出 CDS, 琼脂糖凝胶电泳后, 纯化目的条带, 将纯化的片断用 Ligation high (东洋纺) 并按照产品说明书连接到 pcDNA3.1 (+) 载体 (Invitrogen 公司) 和 pCAGGS 载体 (Gene, 108, 193-200, 1991) 中。将连接反应液用大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (宝酒造) 并按照产品说明书进行转化。纯化质粒后, 通过限制性酶切和琼脂糖电泳确认是否整合了目的基因。

本实施例构建的载体用以下略称表示。

含有 hChMIL、mChMIL、hChMILHis 和 mChMIL 基因的 pcDNA3.1 (+) 载体: pcDNA - hChMIL、pcDNA - mChMIL、pcDNA - hChMILHis 和 pcDNA - mChMILHis

含有 hChMIL、mChMIL、hChMILHis 和 mChMIL 基因的 pCAGGS 载体: pCAGGS - hChMIL、pCAGGS - mChMIL、pCAGGS - hChMILHis 和 pCAGGS - mChMILHis

实施例 5. 融合 FLAG 标记的人可溶性 ChMIL 蛋白质表达载体的构建

在本实施例中所述的 FLAG 标记 (Sigma 公司) 是由 8 个氨基酸构成的标记肽 (Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys), 最后的 5 个氨基酸 (Asp Asp Asp Asp Lys) 是肠激酶的识别序列。本实施例所构建的载体, 可表达在 N 末端融合了前胰岛素原信号序列、FLAG 标记、ChMIL 细胞外区域的 C 末端的蛋白质。用该载体表达的蛋白质, 如后述实施例 9 中的详细叙述, 前胰岛素原信号序列被切断后, 成为可溶性蛋白质分泌到培养液中。用该载体表达的蛋白质融合有 FLAG 标记, 因此可以用抗 FLAG 抗体 (Sigma) 纯化, 也可以用肠激酶消化融合蛋白质, 以去除 FLAG 标记。

构建在 pCAGGS 载体中整合编码 N 末端前胰岛素原和 FLAG 标记 (序列号 20) 的碱基序列 (序列号 19, 含在 Sigma 公司制的 pFLAG - CMV-1 载体中) 的载体。通过 PCR 扩增编码含有序列号 2 所示人 ChMIL 的氨基酸序号 212 至 317 及终止密码子的碱基序列 (序列号 1 的碱基序列号 684 至 1020), 将该扩增产物整合到 pSF 载体的 FLAG 编码碱基序列的 3' 端。PCR 所用的引物序列如序列号 21 (正向引物) 和序列号 8 (反向引物) 所示。对构建的载体中是否整合了目的碱基序

列, 用 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems 公司) 和 ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 并按照产品说明书进行确认。在本实施例中, 整合到载体中的核酸碱基序列示于序列号 22, 其编码的氨基酸序列示于序列号 23。本实施例构建的载体略称为 pSF-shChMIL。

实施例 6. ChMIL mRNA 的表达分析

成熟个体 (10 周龄) 各组织中 ChMIL mRNA 的表达分析: 图 3 (a)

解剖 10 周龄的 C57BL/6 小鼠, 取出各组织, 立刻用液氮冷冻。细
细粉碎冷冻的组织, 用 ISOGEN (日本基因公司) 并按照产品说明书
10 提取各组织的总 RNA。将得到的各组织的总 RNA 1μg 作为模板, 用
Superscript II preamplification kit (GIBCO BRL 公司) 并按照产品说
明书合成 20μL cDNA。RT-PCR 反应体系的总液量定为 50μL, 用
0.5μL 各组织的 cDNA 和 0.25μL ExTaq polymerase (宝酒造), 添加
正向引物 (序列号 9) 和反向引物 (序列号 10) 并使其终浓度分别为
15 0.2μL, 用 GeneAmp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems 公
司), 以 96°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分钟扩增 30 个循环。得到的反
应液在加入了溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 将凝胶在紫外线
照射下摄影, 研究各组织中 ChMIL mRNA 的表达情况。

如图 3 (a) 所示, ChMIL mRNA 在成熟小鼠个体各组织的脑、眼
20 球、骨骼肌、肋骨以及甲状腺中表达。ChM-I 在小鼠各组织的眼球、
胸腺、软骨以及肋骨中表达。这说明 ChMIL 和 ChM-I 在生物体内
的不同组织中表达, 并且它们的生理功能不同的。

胎儿 (妊娠第 17 天) 各组织的 ChMIL mRNA 表达的分析: 图 3 (b)

切开 C57BL/6 小鼠妊娠第 17 天的子宫, 取出胎儿, 将各组织取出
25 后, 立刻液氮冷冻, 从冻结的组织中提取总 RNA、合成 cDNA、进行
RT-PCR 等按上述<成熟小鼠个体各组织中 ChMIL mRNA 的表达分
析>进行。

如图 3 (b) 所示, ChMIL mRNA 在胎儿各组织的眼球、肾脏、胃、
肋骨以及气管中表达。ChMIL mRNA 在小鼠胎儿的肾脏和胃中表达,
30 而在成熟小鼠个体中却未见表达。因此, ChMIL 有可能与这些脏器的
发生以及形态形成有关, 并有可能参与脏器的修复和再生。此外, 在
气管也有 ChMIL mRNA 的表达。

胎儿发育阶段 ChMIL mRNA 的表达分析: 图 3 (c)

切开 C57BL/6 小鼠妊娠第 10 天到出生日各日龄的子宫, 取出胎儿,
35 将胎儿整体用液氮冷冻。从冷冻的胎儿中提取总 RNA、合成 cDNA、

进行 RT-PCR 等按上述<成熟小鼠个体各组织中 ChM1L mRNA 的表达分析>进行。

ChM-I mRNA 的分析, 使用正向引物(序列号 23)和反向引物(序列号 24)并在同样条件下进行。

- 5 如图 3(c) 所示, 在胎儿发育阶段 ChM1L mRNA 的表达, 在妊娠第 10 天非常弱, 第 11 天到第 13 天持续上升。另一方面, ChM-I 的表达和 ChM1L 同样呈上升趋势, 但妊娠第 10 天和第 11 天明显地显示出比 ChM1L 有更强的表达。进而, 在胎儿发育阶段, ChM1L 地表达上升迟于 ChM-I, 这说明两种分子对于胎儿发育具有不同的功能。

10 **实施例 7. 抗 ChM1L 肽多克隆抗体的制备**

- 化学合成在人 ChM1L 的序列号 2 所示 245~252 残基的序列 C 末端具有半胱氨酸的肽。在该合成肽上偶联 MBS/KLH (间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧琥珀酰亚胺酯/匙孔贻血蓝蛋白质, Boehringer Mannheim 公司)。将该复合体溶解在生理盐水中后, 加入等量的 FCA (弗氏完全佐剂), 经超声波处理后调制成乳液。将此乳液注入到兔子的皮下, 进行初次免疫。自初次免疫 4 周后, 使用 FIA (弗氏不完全佐剂) 在大腿肌肉上进行追加免疫, 之后以约 2 周或 4 周为间隔, 通过皮下注射进行 4 次免疫。追加免疫期间从耳廓部分采血, 在最终免疫后进行全采血, 分离血清, 通过胶柱进行亲和纯化, 得到抗 ChM1L 肽抗体。

20 **实施例 8. 人和小鼠 ChM1L 重组蛋白质的蛋白质印迹分析: 图 4**

- 用脂转染试剂 (GIBCO BRL 公司) 并按照产品说明书, 将 pCAGGS、pCAGGS-hChM1L 和 pCAGGS-mChM1L (图 4(a) 和 (c)) 以及 pCAGGS、pCAGGS-hChM1LHis 和 pCAGGS-mChM1LHis (图 4(b) 和 (d)) 转染到 COS7 细胞。转染完了大约 48 小时后, 将培养上清和细胞成分进行 12.5% 胶浓度的 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳), 电泳结束后将转印到硝酸纤维素膜上, 进行一抗反应和二抗反应, 用 ECLplus 试剂 (Amersham Pharmacia 公司) 并按照产品说明书进行显色反应。转染 pCAGGS、pCAGGS-hChM1L 和 pCAGGS-mChM1L 时的蛋白质印迹, 一抗是上述实施例中所述的抗 ChM1L 多肽抗体, 二抗是辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗兔 IgG 抗体 (Dako 公司); 转染 pCAGGS、pCAGGS-hChM1LHis 和 pCAGGS-mChM1LHis 时的蛋白质印迹, 一抗是抗 His 标记抗体 (Invitrogen 公司), 二抗是 HRP 标记的抗小鼠 IgG 抗体 (Amersham Pharmacia 公司)。

用与蛋白质印迹相同的样品进行 SDS - PAGE, 考马氏亮兰 (CBB) 染色的结果如图 4 (a) 和 (b) 所示。

蛋白质印迹的结果表明, 在全部培养上清中没有 ChMIL 条带。细胞成分如图 4 (b) 和 (d) 所示, 重组 ChMIL 蛋白质用抗 ChMIL 肽抗体或抗 His 标记抗体, 在 40kDa 附近均可以检测到两个条带。在上述实施例中有详细阐述, 通过糖链结构的分析, 确认高分子量的条带为结合 N 结合型的糖链的形式。

实施例 9. 可溶性人 ChMIL 重组蛋白质的蛋白质印迹分析: 图 5

用脂转染胺试剂 (GIBCO BRL 公司) 并按照产品说明书, 将 pCAGGS 和 pSF - shChMIL 转染到 COS7 细胞。将培养上清进行 12.5 % 胶浓度的 SDS - PAGE 后, 转印到硝酸纤维素膜上。一抗使用抗 FLAG M2 抗体 (Sigma 公司), 二抗为 HRP 标记的抗小鼠 IgG 抗体 (Amersham Pharmacia 公司)。用 ECLplus 试剂 (Amersham Pharmacia 公司) 并按照产品说明书进行显色反应。

如图 5 所示, 可溶性人 ChMIL 蛋白质在 17~18kDa 附近检测出一个条带。

实施例 10. ChMIL 重组蛋白质的糖链结构分析

用脂转染胺试剂 (GIBCO BRL 公司) 并按照产品说明书, 将 pCAGGS - mChMILhis 转染到 COS7 细胞。向平皿中添加含 2 % SDS 的 PBS, 用细胞刮刀回收细胞。将此悬浊液在 95℃ 加热 60 分钟后, 其上清用 SDS - OUT™ SDS Precipitation kit (Pierce 公司) 处理, 除去 SDS。得到的蛋白质溶液用 Enzymatic Deglycosylation kit (BIO RAD 公司) 并按照产品说明书, 用 NANase II、O - 糖苷酶 DS 和 PNGaseF 处理上述蛋白质溶液, 进行糖链消化反应。将该反应液进行 12.5 % 浓度的 SDS - PAGE 后, 转印到硝酸纤维素膜上。一抗为抗 His 标记抗体 (Invitrogen 公司), 二抗为 HRP 标记的抗小鼠 IgG 抗体 (Amersham Pharmacia 公司)。用 ECLplus 试剂 (Amersham Pharmacia 公司) 并按照产品说明书进行显色反应。

如图 6 所示, ChMIL 蛋白质的高分子量条带, 只有用 PNGaseF 处理时 (泳道 2 和 5) 才可消失。这说明 ChMIL 蛋白质被 N 结合型的糖链所修饰。

实施例 11. 通过免疫染色法分析肋软骨的 ChMIL 蛋白质

解剖约 10 周龄的 C57BL/6 小鼠, 取出完整肋骨, 在含 4 % 多聚甲酸的 10mM 磷酸缓冲液 (PBS, pH7.4) 中进行固定, 用石蜡包埋后, 制作切片。用 histofine SAB - PO (R) 试剂盒并按照产品说明书进行

免疫染色的各步骤,其大致概要如下。脱石蜡处理后,用3%过氧化氢水消化内源性过氧化物酶。用PBS洗涤,用10%正常山羊血清封闭后,按1/160稀释量添加上述抗ChMIL抗体,4℃保温一夜。用兔IgG作为阴性对照。与生物素标记的抗兔IgG抗体和过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白质反应后,加入3,3'-二氨基联苯胺-4HCl进行显色反应,将核用苏木精染色,封固后进行观测。

如图7所示,ChMIL蛋白质表达在肋软骨组织中存在软骨细胞周围并呈现出扁平状成纤维细胞样形态的细胞中。另一方面,在据称表达ChM-I的软骨细胞中没有发现ChMIL的表达。

10 实施例12. 人ChMIL基因的染色体图谱

从日本DNA数据库(DDBJ: DNA data bank of Japan),用人ChMIL基因序列(序列号1),以DDBJ所有数据为对象,进行BLASTN检索。其结果,检索出作为ChMIL基因的基因组序列的基因库登记编号为AL035608的序列。AL035608是位于人X染色体的序列。这表明人ChMIL基因存在于X染色体上。

15 实施例13. 可溶性人ChMIL重组蛋白质的纯化

用脂转染试剂(GIBCO BRL公司)并按照产品说明书,将pSF-shChMIL转染到COS7细胞,约48小时后回收培养上清。用抗FLAG M2亲和胶(Sigma公司)制作亲和柱,将培养上清上到柱中。用25mM Tris-HCl、150mM NaCl(pH7.4)洗柱3次后,用0.1M甘氨酸-HCl(pH3.5)洗脱,用1/20体积的1M Tris-HCl(pH9.5)中和洗脱液。

将培养上清和洗脱液进行SDS-PAGE后,考马氏亮兰(CBB)染色的结果如图8所示。培养上清中存在多种蛋白质(图8,泳道1),洗脱液中可确认可溶性人ChMIL蛋白质约20kDa的条带,这说明通过上述操作浓缩并纯化了可溶性人ChMIL蛋白质(图8、泳道2)。

25 实施例14. 用人脐静脉内皮细胞研究血管新生抑制作用

内皮细胞专用培养基(EGM[®]-2 Bullet Kit[®], Clonetics公司)培养人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs, Clonetics公司)。在12孔平板中添加Growth factor reduced Matrigel(BECTON DICKINSON公司),添加量为600μL/每孔,37℃保温30分钟。用内皮细胞基本培养基(EBM[®]-2, Clonetics公司)将不含肝素的内皮细胞专用培养基稀释至1/8,用得到的培养基调制含有5×10⁴细胞/mL HUVECs的细胞悬浮液。

在0.1M甘氨酸-HCl(pH3.5)中按1/20体积加入1M Tris-HCl(pH9.5),用此溶液调制各待测物质溶液,并以200μL/孔的体积量进

- 行处理。作为阴性对照,用上述缓冲液和 20 μ g/孔的 BSA (牛血清白蛋白) 进行处理。作为阳性对照物质,用 1 和 10 μ g/孔的血小板因子-4 (PF-4、CHEMCON 公司) 进行处理。可溶性人 ChMIL 重组蛋白用 10 和 20 μ g/孔的实施例 13 的洗脱组分进行处理。将 2mL 细胞悬
- 5 浮液(1×10^5 细胞)和 200 μ L 各待测物质溶液混合后,覆盖于用 Growth factor reduced Matrigel 涂布的 12 孔平板上,9 小时后观察微管结构的形成并照相。其结果如图 9 所示。阴性对照 HUVECs 形成了微管结构(图 9(a)和(b)),但用 20 μ g/孔的 ChMIL 进行处理时(图 9(d)),和阴性对照相比较,微管结构的形成受到抑制。
- 10 这说明 ChMIL 具有血管新生抑制作用,并可以明确可溶性的 ChMIL 多肽可以用作糖尿病性视网膜病、癌、类风湿性关节炎等与血管新生有关的疾病的治疗药。

序列表

<110> 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED)

<120> 新型多肽及其编码基因

<130> PGT

<140>

<141>

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1200

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> GDS

<222> (67).. (1020)

<400> 1

ctccacotca gcagggtgtot ctcagtocto tcaagcaag gaaagagtao tgtgtgtga 60

gagacc atg gca aag aat cct oca gag aat tgt gaa gao tgt cao att 108

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile

1 5 10

cta aat gca gaa gct ttt aaa tcc aag aaa ata tgt aaa tca ctt aag 156

Leu Asn Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys

15 20 25 30

att tgt gga otg gtg ttt ggt atc otg gcc cta act cta att gtc otg 204

Ile Cys Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu

35 40 45

t t t t g g g a g o a a g c a c t t o t g g c o g g a g g t a c c o a a a a a g o o t a t	252
P h e T r p G l y S e r L y s H i s P h e T r p P r o G l u V a l P r o L y s L y s A l a T y r	
50 55 60	
g a c a t g g a g c a c a c t t t o t a c a g o a a t g g a g a g a a g a a g a t t t a c	300
A s p M e t G l u H i s T h r P h e T y r S e r A s n G l y G l u L y s L y s L y s I l e T y r	
65 70 75	
a t g g a a a t t g a t c o t g t g a c o a g a a c t g a a a t a t t o a g a a g o g g a a a t	348
M e t G l u I l e A s p P r o V a l T h r A r g T h r G l u I l e P h e A r g S e r G l y A s n	
80 85 90	
g g o a c t g a t g a a a c a t t g g a a g t a c a c g a c t t t a a a a a o g g a t a c a c t	396
G l y T h r A s p G l u T h r L e u G l u V a l H i s A s p P h e L y s A s n G l y T y r T h r	
95 100 105 110	
g g o a t o t a c t t o g t g g g t c t t c a a a a a t g t t t a t o a a a a o t c a g a t t	444
G l y I l e T y r P h e V a l G l y L e u G l n L y s C y s P h e I l e L y s T h r G l n I l e	
115 120 125	
a a a g t g a t t c o t g a a t t t o t g a a c o a g a a g a g a a a t a g a t g a g a a t	492
L y s V a l I l e P r o G l u P h e S e r G l u P r o G l u G l u G l u I l e A s p G l u A s n	
130 135 140	
g a a g a a a t t a c o a c a a c t t t o t t t g a a c a g t c a g t g a t t t g g g t o c o a	540
G l u G l u I l e T h r T h r T h r P h e P h e G l u G l n S e r V a l I l e T r p V a l P r o	
145 150 155	
g o a g a a a g c o t a t t g a a a a c o g a g a t t t t o t t a a a a t t o o a a a a t t	588
A l a G l u L y s P r o I l e G l u A s n A r g A s p P h e L e u L y s A s n S e r L y s I l e	
160 165 170	
c t g g a g a t t t g t g a t a a c g t g a c c a t g t a t t g g a t o a a t c c o a c t o t a	636
L e u G l u I l e C y s A s p A s n V a l T h r M e t T y r T r p I l e A s n P r o T h r L e u	
175 180 185 190	

ata tca gtt tot gag tta caa gac ttt gag gag gag gga gaa gat ott	664
Ile Ser Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu	
195 200 205	
cac ttt oct gac aac gaa aaa aaa ggg att gaa caa aat gaa cag tgg	732
His Phe Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp	
210 215 220	
gtg gto oct caa gtg aaa gta gag aag acc cgt cac gac aga caa gca	780
Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala	
225 230 235	
agt gag gaa gaa ott oca ata aat gac tat act gaa aat gga ata gaa	828
Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu	
240 245 250	
ttt gat ooc atg ctg gat gag aga ggt tat tgt tgt att tac tgc cgt	876
Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg	
255 260 265 270	
oga ggc aac ogo tat tgc ogo ogo gto tgt gaa oct tta ota ggc tao	924
Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr	
275 280 285	
tac oca tat oca tac tgc tac caa gga gga oga gto ato tgt cgt gto	972
Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val	
290 295 300	
ato atg oct tgt aac tgg tgg gtc ggc ogo atg ctg ggg agg gto taa	1020
Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val	
305 310 315	
taggaggttt gagotcaaat gottaaactg ctggcaacat ataataaatg catgotatto	1080
aattgaattto tgcotatgag gcactctggcc ootggtagcc agotctocag aattacttgt	1140
aggaattoc totcttcatt ttctaataaa ctctacatt atcaccaaaa aaaaaaaaaa	1200

<210> 2

<211> 317

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn

1 5 10 15

Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys

20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp

35 40 45

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met

50 55 60

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu

65 70 75 80

Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr

85 90 95

Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile

100 105 110

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val

115 120 125

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu

130 135 140

Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu

145 150 155 160

Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu

165 170 175

Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser

180

185

190

Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe

195

200

205

Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val

210

215

220

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu

225

230

235

240

Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp

245

250

255

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly

260

265

270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro

275

280

285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met

290

295

300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

305

310

315

<210> 3

<211> 1180

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(1012)

<400> 3

agcagtagtc ctctcagtc totcaaagca gggaaagagc accgtgtgt gggagacc

58

atg goa aag aat oct oca gag aac tgt gag ggo tgt cac att ota aat	106
Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn	
1 5 10 15	
gca gaa got ctg aaa tot aag aag ata tgt aaa tca ctg aag att tgt	154
Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys	
20 25 30	
gga ota gtg ttt ggt ato ctg goo tta act ota att gto ctg ttt tgg	202
Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp	
35 40 45	
ggg ago aaa cao tto tgg ccc gag gta tcc aag aaa acc tat gac atg	250
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met	
50 55 60	
gag cao aot tto tao ago aac ggo gag aag aag aag att tao atg gaa	298
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu	
65 70 75 80	
att gat ccc ata acc aga aca gaa ata tto aga agt gga aat ggo aot	346
Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr	
85 90 95	
gat gaa aca ttg gaa gto cat gac ttt aaa aat gga tao aot ggo ato	394
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile	
100 105 110	
tac ttt gta ggt ott caa aaa tgo ttt att aaa act caa atc aaa gtg	442
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val	
115 120 125	
att oct gaa ttt tct gas oca gag gaa gaa ata gat gag aat gaa gaa	490
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu	
130 135 140	

att act aca act tto ttt gaa cag toa gtg att tgg gtt ooc goa gaa	538
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu	
145 150 155 160	
aag cct att gaa aac aga gac tto ctg aaa aat tot aaa att ctg gag	586
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu	
165 170 175	
att tgo gat aat gtg aoc atg tac tgg atc aat ccc act ota ata goa	634
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala	
180 185 190	
gtt toa gaa tta cag gac ttt gag gag gac ggt gaa gat ott oac ttt	682
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe	
195 200 205	
cct acc agt gaa aaa aag ggg att gac cag aat gag oaa tgg gtg gto	730
Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val	
210 215 220	
ooc oaa gtg aag gtg gag aag aoc ogo oac aoc aga oaa goa ago gag	778
Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu	
225 230 235 240	
gaa gac ott oot ata aat gac tat act gaa aat gga att gaa ttt gac	826
Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp	
245 250 255	
coa atg ctg gat gag aga ggt tac tgt tgt att tao tgt ogt oga ggc	874
Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly	
260 265 270	
aaa ogt tao tgo ogo ogt gto tgt gaa oot tta ota ggo tao tao oca	922
Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro	
275 280 285	

tac ccc tac tgc tac caa gga ggt cga gtc atc tgt cgt gtc atc atg 970
 Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
 290 295 300
 oot tgc aac tgg tgg gtg ggc cgc atg ott ggg aga gtc taa 1012
 Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
 305 310 315
 taggaagatt gagttcaaac gottaacctt ctgtagaca atatataatt aatgoatgot 1072
 aotocatgaa ttotgoota tgaggcattt gootccaagt agootatcct tcagaattac 1132
 ttgtaggata ttototott catgttota taaactota catcatca 1180
 <210> 4
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 4
 Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
 20 25 30
 Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
 35 40 45
 Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met
 50 55 60
 Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
 65 70 75 80
 Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
 85 90 95
 Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile

100	105	110	
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val			
115	120	125	
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu			
130	135	140	
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu			
145	150	155	160
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu			
165	170	175	
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala			
180	185	190	
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe			
195	200	205	
Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val			
210	215	220	
Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu			
225	230	235	240
Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp			
245	250	255	
Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly			
260	265	270	
Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro			
275	280	285	
Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met			
290	295	300	
Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val			
305	310	315	

<210> 5

<211> 1197

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rattus norvegicus)

<220>

<221> GDS

<222> (68).. (1021)

<400> 5

actcaaccto agcagtggto totcagtctct ctcaagcaaa ggaagagca ctgtgtgtg 60

ggagacc atg gca aag aat cct cca gag aac tgt gag ggo tgt cac att 109

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile

1

5

10

cta aat gca gaa gct ctg aaa tct aag aag ata cgt aaa tca ctg aag 157

Leu Asn Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Arg Lys Ser Leu Lys

15

20

25

30

att tgt gga cta gtg ttt ggt ato ctg ggc tta aat cta att gto ctg 205

Ile Cys Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu

35

40

45

ttt tgg ggg ago aaa cac tto tgg ccc gag gta tcc aag aag acc tat 253

Phe Trp Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr

50

55

60

ggc atg gag cac act tto tac ago aat ggc gag aag aag aag att tcc 301

Gly Met Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Ser

65

70

75

atg gaa att gat ccc ata acc aga aca gaa ata tto aga agt gga aat 349

Met Glu Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn

80

85

90

ggc acc gat gaa aca ttg gaa gtc cat gac ttt aaa aac gga tac act	397
Gly Thr Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr	
95 100 105 110	
ggc atc tac ttt gta ggt ott caa aaa tgc ttt att aaa act caa ato	445
Gly Ile Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile	
115 120 125	
aaa gtg att cct gaa ttt tot gaa cca gaa gag gaa ata gat gag aat	493
Lys Val Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn	
130 135 140	
gaa gaa att act aca acg ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtt cct	541
Glu Glu Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro	
145 150 155	
gca gaa aag oot att gaa aac aga gao tto ctg aaa aat tot aaa att	589
Ala Glu Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile	
160 165 170	
ctg gag att tgc gac aat gtg act atg tao tgg ato aat ccc act cta	637
Leu Glu Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu	
175 180 185 190	
ata gca gtt tca gaa tta cag gac ttt gag gag gat ggt gaa gat ott	685
Ile Ala Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu	
195 200 205	
cac ttt oot acc ago gaa aaa aaa ggg att gac cag aat gag caa tgg	733
His Phe Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp	
210 215 220	
gtg gtc cca caa gtg aag gtg gag aag acc cgc cgc acc aga caa gca	781
Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg Arg Thr Arg Gln Ala	
225 230 235	

ago gag gaa gao ott oot gtt aat gao tat act gaa aat gga atc gaa 829

Ser Glu Glu Asp Leu Pro Val Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu

240

245

250

ttt gat ooc atg ctg gat gag aga ggt tac tgt tgt att tao tgc ogt 877

Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg

255

260

265

270

oga ggo aao ogo tao tgo ogo agg gtc tgt gaa oot tta cta ggo tao 925

Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr

275

280

285

tac oca tac ooc tao tgo tac oaa gga ggt oga gto ato tgt ogt gto 973

Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val

290

295

300

ato atg oot tgo aao tgg tgg gtg goo ogo atg ott ggg aga gto taa 1021

Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

305

310

315

taggaagttt gagtocaaat gottaacott ttgttagcaa acatataatt aatgoatgat 1081

actccatgaa tttctgcaatt tgootocaag tagootatoo toocagaatta ttgttaggat 1141

attcctotot tcgtgttcta ataaacgtct acatcatcat caaaaaaaaa aaaaaa 1197

<210> 6

<211> 317

<212> PRT

<213> 大鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 6

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn

1

5

10

15

Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Arg Lys Ser Leu Lys Ile Cys

20

25

30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
 35 40 45
 Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Gly Met
 50 55 60
 Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Ser Met Glu
 65 70 75 80
 Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
 85 90 95
 Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
 100 105 110
 Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
 115 120 125
 Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
 130 135 140
 Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
 145 150 155 160
 Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
 165 170 175
 Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala
 180 185 190
 Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe
 195 200 205
 Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
 210 215 220
 Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg Arg Thr Arg Gln Ala Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Asp Leu Pro Val Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp

245	250	255
Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly		
260	265	270
Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro		
275	280	285
Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met		
290	295	300
Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val		
305	310	315

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

gagaccatgg caaagaatcc tccagag

27

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

ttagaccctc cccagcatgc gggc

24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 9

gagaccatgg caaagaatcc tccagag

27

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 10
 ttagactoto ocaagcatgo gggc 24
 <210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 大鼠 (Rattus norvegicus)
 <400> 11
 gagaccatgg caaagaatoc tccagag 27
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 大鼠 (Rattus norvegicus)
 <400> 12
 ttagactoto ocaagcatgo gggc 24
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 13
 gaccotcccc agcatgoggg c 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 14

gactctacca agcatgoggg c

21

<210> 15

<211> 975

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (975)

<400> 15

atg gca aag aat cct cca gag aat tgt gaa gac tgt cac att cta aat

48

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn

1

5

10

15

gca gaa got ttt aaa too aag aaa ata tgt aaa toa ctt aag att tgt

96

Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys

20

25

30

gga ctg gtg ttt ggt atc ctg gcc cta act cta att gto ctg ttt tgg

144

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp

35

40

45

ggg agc aag cac ttc tgg cgg gag gta ccc aaa aaa gcc tat gac atg

192

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met

50

55

60

gag cac act ttc tac agc aat gga gag aag aag aag att tac atg gaa

240

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu

65

70

75

80

att gat cct gtg acc aga act gaa ata ttc aga ago gga aat ggc act

288

Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr	
85 90 95	
gat gaa aca ttg gaa gta cac gac ttt aaa aac gga tac act ggc atc	336
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile	
100 105 110	
tac ttc gtg ggt ctt caa aaa tgt ttt atc aaa act cag att aaa gtg	384
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val	
115 120 125	
att cct gaa ttt tot gaa oca gaa gag gaa ata gat gag aat gaa gaa	432
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu	
130 135 140	
att aac aca act tto ttt gaa cag tca gtg att tgg gtc oca gca gaa	480
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu	
145 150 155 160	
aag cct att gaa aac oga gat ttt ctt aaa aat too aaa att ctg gag	528
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu	
165 170 175	
att tgt gat aac gtg aac atg tat tgg ato aat ccc act cta ata tca	576
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser	
180 185 190	
gtt tot gag tta oaa gac ttt gag gag gag gga gaa gat ctt cac ttt	624
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe	
195 200 205	
cct gcc aac gaa aaa aaa ggg att gaa caa aat gaa cag tgg gtg gtc	672
Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val	
210 215 220	
cct caa gtg aaa gta gag aag aac ogt cac gcc aga caa gca agt gag	720

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu	
225 230 235 240	
gaa gaa ott cca ata aat gac tat aot gaa aat gga ata gaa ttt gat	768
Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp	
245 250 255	
ooo atg ctg gat gag aga ggt tat tgt tgt att tao tgo cgt oga ggo	816
Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly	
260 265 270	
aac ogo tat tgo ogo ogo gto tgt gaa oot tta ota ggo tao tac ooa	864
Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro	
275 280 285	
tat oca tao tgo tac caa gga gga oga gto atc tgt cgt gto atc atg	912
Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met	
290 295 300	
oot tgt aao tgg tgg gtg goo ogo atg ctg ggg agg gto gct cat cat	960
Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val Ala His His	
305 310 315 320	
oat cat cat oat taa	975
His His His His	
<210> 16	
<211> 324	
<212> PRT	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 16	
Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn	
1 5 10 15	
Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys	

20	25	30	
Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp			
35	40	45	
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met			
50	55	60	
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu			
65	70	75	80
Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr			
85	90	95	
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile			
100	105	110	
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val			
115	120	125	
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu			
130	135	140	
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu			
145	150	155	160
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu			
165	170	175	
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser			
180	185	190	
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe			
195	200	205	
Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val			
210	215	220	
Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu			
225	230	235	240

Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp

245

250

255

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly

260

265

270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro

275

280

285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met

290

295

300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val Ala His His

305

310

315

320

His His His His

<210> 17

<211> 975

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(975)

<400> 17

atg gca aag aat cct cca gag aac tgt gag ggc tgt cac att cta aat

48

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn

1

5

10

15

gca gaa got ctg aaa tct aag aag ata tgt aaa toa ctg aag att tgt

96

Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys

20

25

30

gga ota gtg ttt ggt atc ctg gcc tta aat cta att gtc ctg ttt tgg

144

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp

35	40	45	
ggg agc aaa cac ttc tgg ccc gag gta tcc aag aaa aoc tat gao atg			192
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met			
50	55	60	
gag cac act ttc tac agc aac ggc gag aag aag aag att tac atg gaa			240
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu			
65	70	75	80
att gat ccc ata acc aga aca gaa ata ttc aga agt gga aat ggc act			288
Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr			
85	90	95	
gat gaa aca ttg gaa gtc cat gac ttt aaa aat gga tac aot ggc ato			336
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile			
100	105	110	
tao ttt gta ggt ctt caa aaa tgc ttt att aaa act caa ato aaa gtg			384
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val			
115	120	125	
att cct gaa ttt tot gaa coa gag gaa gaa ata gat gag aat gaa gaa			432
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu			
130	135	140	
att act aca act ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtt ccc gca gaa			480
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu			
145	150	155	160
aag cct att gaa aac aga gac ttc ctg aaa aat tot aaa att ctg gag			528
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu			
165	170	175	
att tgc gat aat gtg acc atg tao tgg ato aat ccc act ota ata gca			576
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala			

180	185	190	
gtt toa gaa tta cag gac ttt gag gag gac ggt gaa gat ott oac ttt			624
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe			
195	200	205	
oot acc agt gaa aaa aag ggg att gac cag aat gag caa tgg gtg gtc			672
Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val			
210	215	220	
oog caa gtg aag gtg gag aag aoc cgc cao aoc aga caa goa agc gag			720
Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu			
225	230	235	240
gaa gac ott oot ata aat gac tat act gaa aat gga att gaa ttt gac			768
Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp			
245	250	255	
oaa atg otg gat gag aga ggt tao tgt tgt att tao tgt ogt cga ggo			816
Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly			
260	265	270	
aaocgt tao tgc cgc ogt gto tgt gaa oot tta cta ggo tao tao oca			864
Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro			
275	280	285	
tao oco tao tgc tao caa gga ggt cga gto atc tgt ogt gto atc atg			912
Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met			
290	295	300	
oot tgo aac tgg tgg gtg goo cgc atg ott ggg aga gto gct cat cat			960
Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val Ala His His			
305	310	315	320
cat cat cat cat taa			975
His His His His			

<210> 18

<211> 324

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 18

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn

1 5 10 15

Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys

20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp

35 40 45

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met

50 55 60

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu

65 70 75 80

Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr

85 90 95

Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile

100 105 110

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val

115 120 125

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu

130 135 140

Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu

145 150 155 160

Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu

165 170 175

Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala
 180 185 190
 Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe
 195 200 205
 Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
 210 215 220
 Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
 245 250 255
 Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
 260 265 270
 Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
 275 280 285
 Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
 290 295 300
 Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val Ala His His
 305 310 315 320
 His His His His

<210> 19

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 前胰岛素原的信号序列和FLAG肽

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (69)

<400> 19

atg tot goa ott otg ato cta got ott gtt gga got goa gtt got gao 48

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

tao aaa gao gat gao gao aag 69

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

20

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<223> 人工序列的描述: 前胰岛素原的信号序列和FLAG肽

<400> 20

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

20

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

gaggagaag atcttoactt tcc 23

<210> 22

<211> 432

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 前胰岛素原的信号序列、FLAG肽以及ChM1L
C末端区域

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(432)

<400> 22

atg tot goa ott ctg atc ota got ott gtt gga got goa gtt got gao 48

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

tao aaa gao gat gao gao aag ctg gaa ttc gat gag gga gaa gat ott 96

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe Asp Glu Gly Glu Asp Leu

20 25 30

cao ttt oct goo aao gaa aaa aaa ggg att gaa caa aat gaa cag tgg 144

His Phe Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp

35 40 45

gtg gto cct caa gtg aaa gta gag aag aco cgt cao goo aga caa goa 192

Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala

50 55 60

agt gag gaa gaa ott oca ata aat gao tat act gaa aat gga ata gaa 240

Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu

65 70 75 80

ttt gat ooo atg ctg gat gag aga ggt tat tgt tgt att tao tgo ogt 288

Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg

85 90 95

oga ggc aac ogo tat tgo ogo ogo gto tgt gaa oot tta ota ggo tao 336

Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr

100

105

110

tac oca tat oca tac tgo tac caa gga gga oga gto ato tgt ogt gto 384

Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val

115

120

125

atc atg oot tgt aac tgg tgg gtg goo ogo atg otg ggg agg gto taa 432

Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

130

135

140

<210> 23

<211> 143

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<223> 人工序列的描述: 前胰岛素原的信号序列、FLAG肽以及ChM1L

C末端区域

<400> 23

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1

5

10

15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe Asp Glu Gly Glu Asp Leu

20

25

30

His Phe Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp

35

40

45

Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala

50

55

60

Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu

65

70

75

80

Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg

85	90	95
Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr		
100	105	110
Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val		
115	120	125
Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val		
130	135	140

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 24

tcagccatga cagagaactc a

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 25

ttacaccatg cccaagatgc g

21

hChM-I:人 ChM-I
hChM1L:人 ChM1L

```

hChM-I      MTENS DKVP IALVGPDDVEFCSPPAYATLTVPKSSPARLLKVGAVVLISGAVLLLFGAIG
hChM1L      -----MAKNPPENCEDCHILNABAPKSKR--ICKSLKICGLVPGILALTIVLPWG
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

hChM-I      AFYFWKGS DSHIYNVHYTMSINGKLQDGSMEIDAGNNLETFFKMGS GABEAI AVNDFQNGI
hChM1L      SKHFWPEVPKKAYDMERTFYSNGEKKKIYGEIDFVTRTEIFRSGNGTDETLBVHDFKNGY
              **           *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

hChM-I      TGIRFAGGECYIKAQVKARIFEVGAVTKQSISSKLEGMKMPVKYEENSLI WVAVDQPVK
hChM1L      TGIYFVGLQKCFIKTQIKV-IPEFSEPEEBID----ENEEITTTTFEQSVI WVAEPKPIE
              *** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

hChM-I      DNSPLS-SKVLELCGDLPIFWLKPTYP--KEIQRRERREVVRKI VPTTTKRPSSGPRSNPG
hChM1L      NRDFLKN SKILEICDNVTMYINPTLISVSELQDFEEBEGEDLHFPANEKKGIEQNEQWV
              **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

hChM-I      AGRLMNETRPSVQEDSQAFNPDPYHQEGESMTFDPRLDHEGICCECRS YTHCQKIC
hChM1L      PQVKVETRHAR-----QASEELPINDYTENGIEFDPMLDERGYCC IYCRGRNYCRVVC
              **           *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

hChM-I      EPLGGYYPWFNYQGCRSACRVIMPCSNWVARILGMV
hChM1L      EPLGGYYPFYCYQGGRVICRVIMPCSNWVARMLGRV
              *** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

图 1A

hChM1L :人 ChM1L
mChM1L :小鼠 ChM1L
rChM1L :大鼠ChM1L

```

mChM1L      MAKNPPECEGCHILNAEALKSKKICKSLKICGLVFGILALTLIVLFWGSKHPWPEVSKK
rChM1L      MAKNPPECEGCHILNAEALKSKKIRKSLKICGLVFGILALTLIVLFWGSKHPWPEVSKK
hChM1L      MAKNPPECEGCHILNAEAFKSKKICKSLKICGLVFGILALTLIVLFWGSKHPWPEVPPK
*****

mChM1L      TYDMEHTFYSNGEKKKIYMEIDPITRTEIFRSGNGTDETLVHDFKNGYTGIIYFVGLQKC
rChM1L      TYGMEHTFYSNGEKKKIYMEIDPITRTEIFRSGNGTDETLVHDFKNGYTGIIYFVGLQKC
hChM1L      AYDMEHTFYSNGEKKKIYMEIDPVERTEIFRSGNGTDETLVHDFKNGYTGIIYFVGLQKC
*****

mChM1L      FIKTQIKVIPETSEPEEIDENEIEITTTFFEQSVIWPAAKPIENRDFLNKSKILEICDN
rChM1L      FIKTQIKVIPETSEPEEIDENEIEITTTFFEQSVIWPAAKPIENRDFLNKSKILEICDN
hChM1L      FIKTQIKVIPETSEPEEIDENEIEITTTFFEQSVIWPAAKPIENRDFLNKSKILEICDN
*****

mChM1L      VTMWINPTLIAVSELQDFEEDGEDLHFFTSEKKGIDQNEQWVVPQVKVEKTRHTRQASE
rChM1L      VTMWINPTLIAVSELQDFEEDGEDLHFFTSEKKGIDQNEQWVVPQVKVEKTRHTRQASE
hChM1L      VTMWINPTLISVSELQDFEEDGEDLHFPANEKKGIEQNEQWVVPQVKVEKTRHARQASE
*****

mChM1L      EDLPINDYTENGIEFDPMLDERGYCCICYCRAGNRYCARVCEPLLGYYYPYCYQGGRVIC
rChM1L      EDLPVNDYTENGIEFDPMLDERGYCCICYCRAGNRYCARVCEPLLGYYYPYCYQGGRVIC
hChM1L      EELPINDYTENGIEFDPMLDERGYCCICYCRAGNRYCARVCEPLLGYYYPYCYQGGRVIC
*****

mChM1L      RVIMPCNWWVARM LGRV
rChM1L      RVIMPCNWWVARM LGRV
hChM1L      RVIMPCNWWVARM LGRV
*****

```

图 1B

- (a) hChM-I : 人 ChM-I
(b) hChM1L : 人 ChM1L
(c) mChM1L : 小鼠 ChM1L

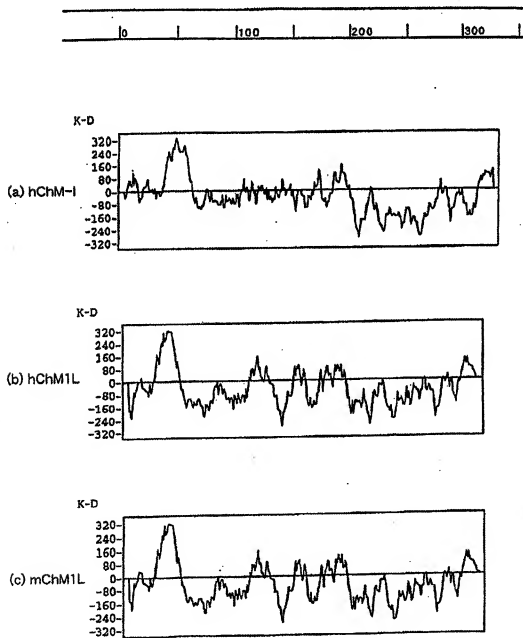


图 2

(a) 成数个体 (10周龄) 各组织中的表达

1. 脑、2. 眼球、3. 肺、4. 胸腺、5. 心脏、6. 肝脏、7. 肾脏、8. 胃、9. 脾脏、
10. 骨骼肌、11. 肋骨、12. 脂肪、13. 肾上腺、14. 垂体、15. 甲状腺、16. 肠道

(b) 胎儿 (妊娠第17天) 各组织中的表达

1. 脑、2. 眼球、3. 肺、4. 胸腺、5. 心脏、6. 肝脏、7. 肾脏、8. 脾脏、9. 胃、
10. 肠道、11. 肋骨、12. 气管、13. 胰腺

(c) 胎儿发育阶段中的表达

1. 妊娠10天、2. 妊娠11天、3. 妊娠12天、4. 妊娠13天、5. 妊娠14天、
6. 妊娠15天、7. 妊娠16天、8. 妊娠17天、9. 妊娠18天、10. 出生日

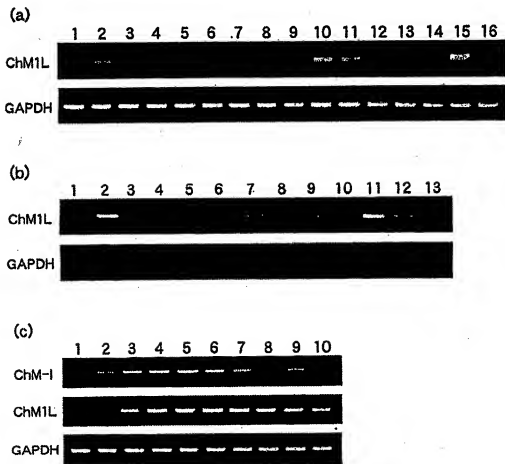


图 3

- (a) SDS-PAGE : 1.分子量标准、2.人ChM1L、3.小鼠ChM1L
 (b) SDS-PAGE : 1.分子量标准、2.人ChM1L(His)、3.小鼠ChM1L(His)
 (c) Western blot (用抗肽抗体检测):
 1.分子量标准、2.人ChM1L、3.小鼠ChM1L
 (d) Western blot (用抗His抗体检测):
 1.分子量标准、2.人ChM1L(His)、3.小鼠ChM1L(His)

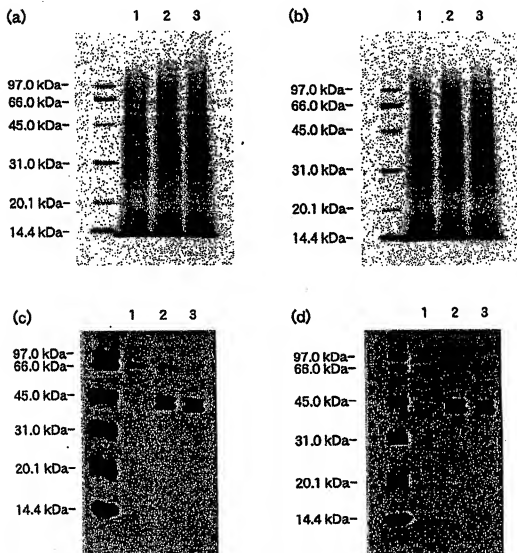


图 4

1. 分子量标准
2. 可溶性人 ChM1L



图 5

1. 未处理、2. NANase II + O-Glycosidase DS + PNGase F处理、
3. NANase II处理、4. O-Glycosidase DS处理、5. PNGase F处理

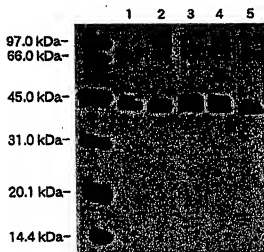
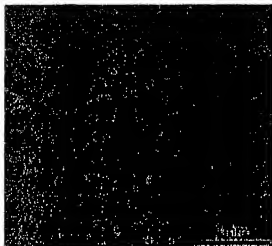


图 6

(a) 兔 IgG



(b) 抗 CHM1L 肽抗体

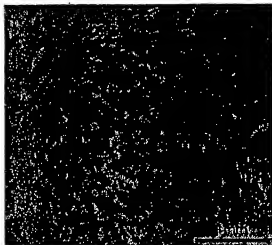


图 7

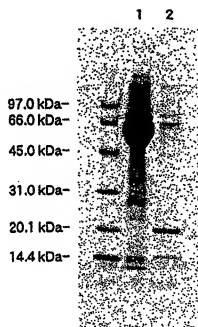


图 8

(a) 缓冲液对照

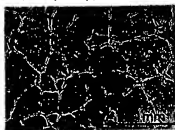
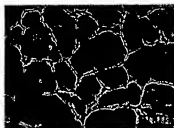
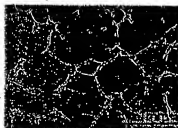
(b) BSA (20 μ g/孔)(c) shChM1L (10 μ g/孔)(d) shChM1L (20 μ g/孔)(e) PF-4 (1 μ g/孔)(f) PF-4 (10 μ g/孔)

图 9